

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月20日
Date of Application:

Toshihide EZOE, et al. Q79759
BIOSENSOR
Mark Boland 202-293-7060
February 18, 2004
5 of 6

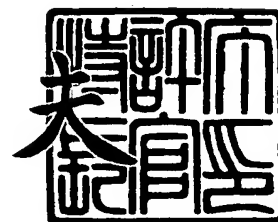
出願番号 特願2003-077782
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-077782]

出願人 富士写真フイルム株式会社
Applicant(s):

2004年 1月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康



出証番号 出証特2003-3108543

【書類名】 特許願

【整理番号】 A31164A

【提出日】 平成15年 3月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 江副 利秀

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 久保 利昭

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 塚田 芳久

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

 【氏名】 山之内 淳一

【特許出願人】

 【識別番号】 000005201

 【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

 【識別番号】 110000109

 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

 【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205141

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 表面プラズモン共鳴測定装置に用いられる測定チップ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように、かつ、種々の入射角成分を含むようにして入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態を検出する光検出手段とを備えてなる表面プラズモン共鳴測定装置に用いられるための測定チップであって、上記誘電体ブロックと上記金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む 1 つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化され、かつ前記金属膜が疎水性高分子化合物でコーティングされている上記の測定チップ。

【請求項 2】 疎水性高分子化合物でコーティングされた金属膜の表面に生理活性物質を固定化することができる官能基を有する、請求項 1 に記載の測定チップ。

【請求項 3】 生理活性物質を固定化することができる官能基が、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 、 $-NR^1R^2$ （式中、 R^1 及び R^2 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-CHO$ 、 $-NR^3NR^1R^2$ （式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-NCO$ 、 $-NCS$ 、エポキシ基、またはビニル基である、請求項 2 に記載の測定チップ。

【請求項 4】 生理活性物質が共有結合により表面に結合している、請求項 1 から 3 の何れかに記載の測定チップ。

【請求項 5】 請求項 1 から 3 の何れかに記載の測定チップと生理活性物質とを接触させて、該測定チップの表面に該生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、測定チップに生理活性物質を固定化する方法。

【請求項 6】 生理活性物質が共有結合により表面に結合している請求項 1 から 3 の何れかに記載の測定チップと被験物質とを接触させる工程を含む、該生

理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法。

【請求項 7】 請求項 1 から 3 の何れかに記載の測定チップを有する表面プラズモン共鳴測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、表面プラズモン共鳴測定装置に用いられる測定チップ、及びそれを用いた生体分子間の相互作用を分析する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、臨床検査等で免疫反応など分子間相互作用を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、測定物質の結合量変化を高感度に検出することのできるいくつかの技術が使用されている。例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）測定技術、水晶発振子マイクロバランス（QCM）測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術である。SPR測定技術はチップの金属膜に接する有機機能膜近傍の屈折率変化を反射光波長のピークシフト又は一定波長における反射光量の変化を測定して求めることにより、表面近傍に起こる吸着及び脱着を検知する方法である。QCM測定技術は水晶発振子の金電極（デバイス）上の物質の吸脱着による発振子の振動数変化から、ngレベルで吸脱着質量を検出できる技術である。また、金の超微粒子（nmレベル）表面を機能化させて、その上に生理活性物質を固定して、生理活性物質間の特異認識反応を行わせることによって、金微粒子の沈降、配列から生体関連物質の検出ができる。

【0003】

上記した技術においては、いずれの場合も、生理活性物質を固定化する表面が重要である。以下、当技術分野で最も使われている表面プラズモン共鳴（SPR）を例として、説明する。

【0004】

一般に使用される測定チップは、透明基板（例えば、ガラス）、蒸着された金

属膜、及びその上に生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜からなり、その官能基を介し、金属表面に生理活性物質を固定化する。該生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定することによって、生体分子間の相互作用を分析する。

【0005】

生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜としては、金属と結合する官能基、鎖長の原子数が10以上のリンカー、及び生理活性物質と結合できる官能基を有する化合物を用いて、生理活性物質を固定化した測定チップが報告されている（特許文献1を参照）。また、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜からなる測定チップが報告されている（特許文献2を参照）。

【0006】

一方、生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定する場合、検体物質は必ずしも単一成分ではなく、例えば細胞抽出液中などのような不均一系で検体物質を測定することも要求される。その場合、種々の蛋白質、脂質などの夾雑物が検出表面に非特異的な吸着を起こすと、測定検出感度が著しく低下する。上記の検出表面では、非特異吸着が極めて起こりやすく問題があった。

【0007】

この問題を解決するためにいくつかの方法が検討されている。例えば、金属表面にリンカーを介し、親水性のハイドロゲルを固定化することで、物理吸着を抑制する方法も使用されてきた（特許文献1、特許文献3及び特許文献4を参照）。しかしながら、この方法でも非特異吸着の抑制性は十分なレベルではなかった。

【0008】**【特許文献1】**

特許第2815120号

【特許文献2】

特開平9-264843号

【特許文献3】

米国特許第5436161号

【特許文献 4】

特開平 8-193948 号公報

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記した従来技術の問題を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、非特異吸着を抑制し、かつ安定した測定ベースラインを与えることができる、表面プラズモン共鳴測定装置に用いられる測定チップを提供することを解決すべき課題とした。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、誘電体ブロックと金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む 1 つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化され、かつ前記金属膜が疎水性高分子化合物でコーティングされている測定チップを、誘電体ブロック、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜、光源、光学系、および光検出手段とを備えてなる表面プラズモン共鳴測定装置において用いることにより、非特異吸着を抑制し、かつ安定した測定ベースラインを与えることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本発明によれば、誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように、かつ、種々の入射角成分を含むようにして入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態を検出する光検出手段とを備えてなる表面プラズモン共鳴測定装置に用いられるための測定チップであって、上記誘電体ブロックと上記金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む 1 つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一

体化され、かつ前記金属膜が疎水性高分子化合物でコーティングされている上記の測定チップが提供される。

【0012】

好ましくは、本発明の測定チップは、疎水性高分子化合物でコーティングされた金属膜の表面に生理活性物質を固定化することができる官能基を有する。

好ましくは、生理活性物質を固定化することができる官能基は、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 、 $-NR^1R^2$ （式中、 R^1 及び R^2 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-CHO$ 、 $-NR^3NR^1R^2$ （式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-NCO$ 、 $-NCS$ 、エポキシ基、またはビニル基である。

【0013】

本発明の別の側面によれば、生理活性物質が共有結合により表面に結合している上記の測定チップが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の測定チップと生理活性物質とを接触させて、該測定チップの表面に該生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、測定チップに生理活性物質を固定化する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、生理活性物質が共有結合により表面に結合している上記の測定チップと被験物質とを接触させる工程を含む、該生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の測定チップを有する表面プラズモン共鳴測定装置が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明の測定チップは、本明細書中に記載した構成を有する表面プラズモン共鳴測定装置に用いられるための測定チップであって、誘電体ブロックとこの誘電体ブロックの一面に形成された金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む1つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化され

、かつ前記金属膜が疎水性高分子化合物でコーティングされていることを特徴とする。

【0015】

本発明で用いる疎水性高分子化合物は、吸水性を有しない高分子化合物であり、水への溶解度（25℃）が10%以下、より好ましくは1%以下、最も好ましくは0.1%以下である。

【0016】

疎水性高分子化合物を形成する疎水性単量体としては、ビニルエステル類、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、オレフィン類、スチレン類、クロトン酸エステル類、イタコン酸ジエステル類、マレイン酸ジエステル類、フマル酸ジエステル類、アリル化合物類、ビニルエーテル類、ビニルケトン類等から任意に選ぶことができる。疎水性高分子化合物としては、1種類のモノマーから成るホモポリマーでも、2種類以上のモノマーから成るコポリマーでもよい。

【0017】

本発明で好ましく用いられる疎水性高分子化合物としては、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリビニルクロライド、ポリメチルメタクリレート、ポリエステル、ナイロンなどが挙げられる。

【0018】

疎水性高分子化合物の金属膜へのコーティングは常法によって行うことができ、例えば、スピン塗布、エアナイフ塗布、バー塗布、ブレード塗布、スライド塗布、カーテン塗布、さらにはスプレー法、蒸着法、キャスト法、浸漬法等によって行うことができる。

【0019】

疎水性高分子化合物のコーティング厚さは特に限定されないが、好ましくは10000オングストローム以上50000オングストローム以下であり、特に好ましくは10000オングストローム以上30000オングストローム以下である。

【0020】

金属膜を構成する金属としては、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。好ましくは金、銀、銅、アルミニウム、白金等の自由

電子金属が挙げられ、特に金が好ましい。それらの金属は単独又は組み合わせて使用することができる。また、上記金属膜への付着性を考慮して、基板と金属からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【0021】

金属膜の膜厚は任意であるが、例えば、表面プラズモン共鳴測定装置用を考えた場合、1オングストローム以上5000オングストローム以下であるのが好ましく、特に10オングストローム以上2000オングストローム以下であるのが好ましい。5000オングストロームを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、1オングストローム以上、100オングストローム以下であるのが好ましい。

【0022】

金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。

【0023】

金属膜は好ましくは基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置される」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む意味である。本発明で 사용할 ことができる基板としては例えば、表面プラズモン共鳴測定装置用を考えた場合、一般的にはBK7等の光学ガラス、あるいは合成樹脂、具体的にはポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、シクロオレフィンポリマーなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。

【0024】

疎水性高分子化合物でコーティングした金属膜においては、最表面に生理活性物質を固定化することができる官能基を有することが好ましい。ここで言う「最表面」とは、「金属膜から最も遠い側」という意味である。

【0025】

好ましい官能基としては $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ （式中、 R^1 及び R^2 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{NR}^3\text{NR}^1\text{R}^2$ （式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{NCS}$ 、エポキシ基、またはビニル基などが挙げられる。ここで、低級アルキル基における炭素数は特に限定されないが、一般的には $\text{C}1\sim\text{C}10$ 程度であり、好ましくは $\text{C}1\sim\text{C}6$ である。

【0026】

最表面にそれらの官能基を導入する方法としては、それらの官能基の前駆体を含有する疎水性高分子を金属表面あるいは金属膜上にコーティングした後、化学処理により最表面に位置する前駆体からそれらの官能基を生成させる方法が挙げられる。例えば $-\text{COOCH}_3$ 基を含有する疎水性高分子化合物であるポリメチルメタクリレート（PMMA）を金属膜上にコーティングした後、その表面を NaOH 水溶液（1N）に 40°C 16時間接触させると、最表面に $-\text{COOH}$ 基が生成する。

【0027】

上記のようにして得られた測定チップにおいて、上記の官能基を介して生理活性物質を共有結合させることによって、金属膜に生理活性物質を固定化することができる。

【0028】

本発明の測定チップの表面上に固定される生理活性物質としては、測定対象物と相互作用するものであれば特に限定されず、例えば免疫蛋白質、酵素、微生物、核酸、低分子有機化合物、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖鎖、脂肪酸もしくは脂肪酸エステル、あるいはリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドなどが挙げられる。

【0029】

免疫蛋白質としては、測定対象物を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ち IgG 、 IgM 、 IgA 、 IgE 、 IgD を使用することができる。具体的には、測定対象物がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用すること

ができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157などに対する抗体等を使用することができる。

【0030】

酵素としては、測定対象物又は測定対象物から代謝される物質に対して活性を示すものであれば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、測定対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、測定対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

【0031】

微生物としては、特に限定されることなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物を使用することができる。

核酸としては、測定の対象とする核酸と相補的にハイブリダイズするものを使用することができる。核酸は、DNA（cDNAを含む）、RNAのいずれも使用できる。DNAの種類は特に限定されず、天然由来のDNA、遺伝子組換え技術により調製した組換えDNA、又は化学合成DNAの何れでもよい。

低分子有機化合物としては通常の有機化学合成の方法で合成することができる任意の化合物が挙げられる。

【0032】

非免疫蛋白質としては、特に限定されることなく、例えばアビジン（ストレプトアビジン）、ビオチン又はレセプターなどを使用できる。

免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテ

ン G、リウマチ因子 (RF) 等を使用することができる。

糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられる。

脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ベヘン酸エチル等が挙げられる。

【0033】

生理活性物質が抗体や酵素などの蛋白質又は核酸である場合、その固定化は、生理活性物質のアミノ基、チオール基等を利用し、金属表面の官能基に共有結合させることで行うことができる。

【0034】

上記のようにして生理活性物質を固定化した測定チップは、当該生理活性物質と相互作用する物質の検出及び／又は測定のために使用することができる。

【0035】

即ち、本発明によれば、生理活性物質が固定化された本発明の測定チップを用いて、これに被験物質を接触させることにより、該測定チップに固定化されている生理活性物質と相互作用する物質を検出及び／又は測定する方法が提供される。

被験物質としては例えば、上記した生理活性物質と相互作用する物質を含む試料などを使用することができる。

【0036】

本発明では、測定チップの表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用を表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定技術により検出する。

【0037】

表面プラズモン共鳴の現象は、ガラス等の光学的に透明な物質と金属薄膜層との境界から反射された単色光の強度が、金属の出射側にある試料の屈折率に依存することによるものであり、従って、反射された単色光の強度を測定することにより、試料を分析することができる。

【0038】

次に、本発明の測定チップを備えた表面プラズモン共鳴測定装置について説明

する。

表面プラズモン共鳴測定装置とは、表面プラズモンが光波によって励起される現象を利用して、被測定物質の特性を分析するための装置である。

【0039】

本発明で用いられる表面プラズモン共鳴測定装置は、誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように、かつ、種々の入射角成分を含むようにして入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態を検出する光検出手段とを備える。

【0040】

また、前記の通り、前記誘電体ブロックは、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む1つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化されている。さらには前記金属膜が疎水性高分子化合物でコーティングされている。

【0041】

本発明では、具体的には、特開2001-330560号公報記載の図1～図32で説明されている表面プラズモン共鳴測定装置、特開2002-296177号公報記載の図1～図15で説明されている表面プラズモン共鳴測定装置を好ましく用いることができる。特開2001-330560号公報および特開2002-296177号公報に記載の内容は全て本明細書の開示の一部として本明細書中に引用するものとする。

【0042】

例えば、特開2001-330560号公報記載の表面プラズモン共鳴測定装置としては、例えば、誘電体ブロック、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜からなる薄膜層、およびこの薄膜層の表面上に試料を保持する試料保持機構を備えてなる複数の測定ユニットと、これら複数の測定ユニットを支持した支持体と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと前記金属膜との界面で全反射条件が得られるように種

々の入射角で入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して、表面プラズモン共鳴による全反射減衰の状態を検出する光検出手段と、前記複数の測定ユニットの各誘電体ブロックに関して順次前記全反射条件および種々の入射角が得られるように、前記支持体と前記光学系および光検出手段とを相対移動させて、各測定ユニットを順次前記光学系および光検出手段に対して所定位置に配置する駆動手段とを備えてなることを特徴とする表面プラズモン共鳴測定装置が挙げられる。

【0043】

なお、上記の測定装置においては、例えば前記光学系および光検出手段が静止状態に保たれるものとされ、前記駆動手段が、前記支持体を移動させるものとされる。

【0044】

その場合、前記支持体は、回転軸を中心とする円周上に前記複数の測定ユニットを支持するターンテーブルであり、また前記駆動手段は、このターンテーブルを間欠的に回転させるものであることが望ましい。またこの場合、前記支持体として、前記複数の測定ユニットを直線的に1列に並べて支持するものを用い、前記駆動手段として、この支持体を前記複数の測定ユニットの並び方向に間欠的に直線移動させるものを適用してもよい。

【0045】

一方、上記とは反対に、前記支持体が静止状態に保たれるものであり、前記駆動手段が、前記光学系および光検出手段を移動させるものであっても構わない。

【0046】

その場合、前記支持体は、円周上に前記複数の測定ユニットを支持するものであり、前記駆動手段は、前記光学系および光検出手段を、前記支持体に支持された複数の測定ユニットに沿って間欠的に回転させるものであることが望ましい。またこの場合、前記支持体として、前記複数の測定ユニットを直線的に1列に並べて支持するものを用い、前記駆動手段として、前記光学系および光検出手段を、前記支持体に支持された複数の測定ユニットに沿って間欠的に直線移動させるものを適用してもよい。

【0047】

他方、前記駆動手段が、その回動軸を支承するところが軸受けを有するものである場合、この駆動手段は、該回動軸を一方向に回動させて前記複数の測定ユニットに対する一連の測定が終了したならば、この回動量と同量だけ該回動軸を他方向に戻してから、次回の一連の測定のためにこの回動軸を前記一方向に回動させるように構成されることが望ましい。

【0048】

また上記の測定装置においては、前記複数の測定ユニットが連結部材により1列に連結されてユニット連結体を構成し、前記支持体が、このユニット連結体を支持するように構成されていることが望ましい。

【0049】

また上記の測定装置においては、前記支持体に支持されている複数の測定ユニットの各試料保持機構に、自動的に所定の試料を供給する手段が設けられることが望ましい。

【0050】

さらに上記の測定装置においては、前記測定ユニットの誘電体ブロックが前記支持体に固定され、測定ユニットの薄膜層および試料保持機構が一体化されて測定チップを構成し、この測定チップが上記誘電体ブロックに対して交換可能に形成されていることが望ましい。

【0051】

そして、このような測定チップを適用する場合は、この測定チップを複数収納したカセットと、このカセットから測定チップを1つずつ取り出して、前記誘電体ブロックと組み合う状態に供給するチップ供給手段とが設けられることが望ましい。

【0052】

あるいは、測定ユニットの誘電体ブロック、薄膜層および試料保持機構が一体化されて測定チップを構成し、この測定チップが前記支持体に対して交換可能に形成されてもよい。

【0053】

測定チップをそのような構成とする場合は、この測定チップを複数収納したカセットと、このカセットから測定チップを1つずつ取り出して、支持体に支持される状態に供給するチップ供給手段とが設けられることが望ましい。

【0054】

他方、前記光学系は、光ビームを誘電体ブロックに対して収束光あるいは発散光の状態に入射させるように構成され、そして前記光検出手段は、全反射した光ビームに存在する、全反射減衰による暗線の位置を検出するように構成されることが望ましい。

【0055】

また上記光学系は、光ビームを前記界面にデフォーカス状態で入射させるものとして構成されることが望ましい。そのようにする場合、光ビームの上記界面における、前記支持体の移動方向のビーム径は、この支持体の機械的位置決め精度の10倍以上とされることが望ましい。

【0056】

さらに上記の測定装置において、測定ユニットは前記支持体の上側に支持され、前記光源は前記支持体より上の位置から下方に向けて前記光ビームを射出するように配設され、前記光学系は、前記下方に向けて射出された前記光ビームを上方に反射して、前記界面に向けて進行させる反射部材を備えていることが望ましい。

【0057】

また、上記の測定装置において、前記測定ユニットは前記支持体の上側に支持され、前記光学系は、前記光ビームを前記界面の下側から該界面に入射させるように構成され、前記光検出手段は前記支持体よりも上の位置で光検出面を下方に向けて配設されるとともに、前記界面で全反射した光ビームを上方に反射して、前記光検出手段に向けて進行させる反射部材が設けられることが望ましい。

【0058】

他方、上記の測定装置においては、前記支持体に支持される前および／または支持された後の前記測定ユニットを、予め定められた設定温度に維持する温度調節手段が設けられることが望ましい。

【0059】

また、上記の測定装置においては、前記支持体に支持された測定ユニットの試料保持機構に貯えられた試料を、前記全反射減衰の状態を検出する前に攪拌する手段が設けられることが望ましい。

【0060】

また、上記の測定装置においては、前記支持体に支持された複数の測定ユニットの少なくとも1つに、前記試料の光学特性と関連した光学特性を有する基準液を供給する基準液供給手段が設けられるとともに、前記光検出手段によって得られた、試料に関する前記全反射減衰の状態を示すデータを、前記基準液に関する前記全反射減衰の状態を示すデータに基づいて補正する補正手段が設けられることが望ましい。

【0061】

そのようにする場合、試料が被検体を溶媒に溶解させてなるものであるならば、前記基準液供給手段は、基準液として前記溶媒を供給するものであることが望ましい。

【0062】

さらに、上記の測定装置は、測定ユニットの各々に付与された、個体識別情報を示すマークと、測定に使用される測定ユニットから前記マークを読み取る読取手段と、測定ユニットに供給される試料に関する試料情報を入力する入力手段と、測定結果を表示する表示手段と、この表示手段、前記入力手段および前記読取手段に接続されて、各測定ユニット毎の前記個体識別情報と前記試料情報とを対応付けて記憶するとともに、ある測定ユニットに保持された試料について求められた測定結果を、その測定ユニットに関して記憶されている前記個体識別情報および前記試料情報と対応付けて前記表示手段に表示させる制御手段とを備えることが望ましい。

【0063】

上記した測定装置を用いて生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する場合、前記測定ユニットの1つにおける試料に関して全反射減衰の状態を検出した後、前記支持体と前記光学系および光検出手段とを相対移動させて、別の

測定ユニットにおける試料に関して全反射減衰の状態を検出し、その後前記支持体と前記光学系および光検出手段とを相対移動させて、前記1つの測定ユニットにおける試料に関して、再度全反射減衰の状態を検出することにより測定を行うことができる。

以下の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0064】

【実施例】

以下の実験は、特開2001-330560号公報の図22に記載の装置（以下、本発明の表面プラズモン共鳴測定装置と呼ぶ）（本明細書において図1として示す）、及び同公報の図23に記載の誘電体ブロック（以下、本発明の誘電体ブロックと呼ぶ）（本明細書において図2として示す）を用いて行った。

【0065】

図1に示す表面プラズモン共鳴測定装置は、測定ユニットを支持する支持体として、互いに平行に配された2本のガイドロッド400,400に摺動自在に係合し、それらに沿って図中の矢印Y方向に直線移動自在とされたスライドブロック401が用いられている。そしてこのスライドブロック401には、上記ガイドロッド400,400と平行に配された精密ねじ402が螺合され、この精密ねじ402はそれとともに支持体駆動手段を構成するパルスモータ403によって正逆回転されるようになっている。

【0066】

なおこのパルスモータ403の駆動は、モータコントローラ404によって制御される。すなわちモータコントローラ404には、スライドブロック401内に組み込まれてガイドロッド400,400の長手方向における該スライドブロック401の位置を検出するリニアエンコーダ（図示せず）の出力信号S40が入力され、モータコントローラ404はこの信号S40に基づいてパルスモータ403の駆動を制御する。

【0067】

またガイドロッド400,400の側下方には、それに沿って移動するスライドブロック401をそれぞれ左右から挟む形で、レーザ光源31および集光レンズ32と、光

検出器40とが配設されている。集光レンズ32は光ビーム30を集光する。また、光検出器40が設置されている。

【0068】

ここで本実施形態においては、一例として8個の測定ユニット10を連結固定してなるスティック状のユニット連結体410が用いられ、測定ユニット10は8個一列に並べた状態でスライドブロック401にセットされるようになっている。

【0069】

図2は、このユニット連結体410の構造を詳しく示すものである。ここに示される通りユニット連結体410は、測定ユニット10が8個、連結部材411により連結されてなるものである。

【0070】

この測定ユニット10は、誘電体ブロック11と試料保持枠13とを例えば透明樹脂等から一体成形してなるものであり、ターンテーブルに対して交換可能な測定チップを構成している。交換可能とするためには、例えばターンテーブルに形成された貫通孔に、測定ユニット10を嵌合保持させる等すればよい。なお本例では、金属膜12の上にセンシング物質14が固定されている。

【0071】

実施例1：測定チップの作製

(1) 比較例：SAM化合物（7-カルボキシ-1-ヘプタンチオール）で被覆処理した測定チップの作製（SAM：自己組織化膜）

金属膜として50nmの金が蒸着された本発明の誘電体ブロックをModel-208UV-オゾンクリーニングシステム（TECHNOVISION INC.）で30分間処理した後、1mMの7-カルボキシ-1-ヘプタンチオール（同仁化学）のエタノール溶液を金属膜に接触するように添加し、25℃で18時間表面処理を行った。その後、エタノールで5回、エタノール/水混合溶媒で1回、水で5回洗浄を行った。このサンプルをSAM処理チップと呼ぶ。

【0072】

(2) ポリメチルメタクリレート（PMMA）膜の作成

金属膜として50nmの金が蒸着された本発明の誘電体ブロックをModel-208UV

ーオゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した後、0.5 mg/mlのポリメチルメタクリレートのメチルエチルケトン溶液5 μ lを金属膜に接触するように添加し、5℃で15分間静置した。

【0073】

(3) ポリメチルメタクリレート膜をNaOHで処理した測定チップの作成

前記(2)で得られたサンプルに1N NaOH水溶液をPMMA膜に接触するように添加し、60℃5時間静置した後、水で3回洗浄した。このサンプルをPMMA/NaOH処理チップと呼ぶ。

【0074】

(4) ポリスチレン (PS) 膜の作成

金属膜として50nmの金が蒸着された本発明の誘電体ブロックをModel-208 UVーオゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した後、0.5 mg/mlのポリスチレンのメチルエチルケトン溶液5 μ lを金属膜に接触するように添加し、5℃で15分間静置した。

(5) ポリスチレン膜をオゾン処理した測定チップの作成

前記(2)で得られたサンプルをModel-208 UVーオゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で30分間処理した。このサンプルをPS/オゾン処理チップと呼ぶ。

【0075】

実施例2：測定チップの性能評価：

(1) 蛋白質の非特異吸着の測定

測定チップ表面に対する非特異的な蛋白質の吸着はノイズの原因となる為、極力少ないほうが好ましい。以下方法により各バイオセンサー用チップに対するBSA (シグマ製)、アビジン (ナカライテスク製) の非特異吸着性を評価した。

【0076】

SAM処理チップ (実施例1-(1)の方法で作製)、PMMA/NaOH処理チップ (実施例1-(3)の方法で作製)、PS/オゾン処理チップ (実施例1-(5)の方法で作製) に、1-エチル-2, 3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (400 mM) とN-ヒドロキシスクシンイミド (100 mM) との混合液を

添加し、20分間静置した。さらに水で洗浄後、エタノールアミン・HCl溶液（1M、pH8.5）を各測定チップに添加し、20分間静置後、HBS-EPバッファー（ピアコア社製、pH7.4）で洗浄した。

なお、上記で用いたHBS-EPバッファーの組成は、H E P E S（N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonicAcid）0.01mol/l（pH7.4）、N a C l 0.15mol/l、E D T A 0.003mol/l、S u r f a c t a n t P 2 0 0.005重量%である。

【0077】

次にそれらの測定チップを本発明の表面プラズモン共鳴測定装置に設置し、BSA溶液（2mg/ml、HBS-EPバッファー）あるいはアビジン溶液（2mg/ml、HBS-EPバッファー）を添加し、10分間静置した。その後、HBS-EPバッファーで洗浄し、3分後の共鳴シグナル（RU値）変化量を各蛋白質の非特異吸着量とした。

【0078】

（2）蛋白質・検体化合物間の相互作用の測定

各測定用チップにニュートラルアビジン（PIERCE製）を固定化し、D-ビオチン（ナカライテスク製）との相互作用測定を以下の方法で行った。

【0079】

SAM処理チップ（実施例1-（1）の方法で作製）、PMMA/NaOH処理チップ（実施例1-（3）の方法で作製）、PS/オゾン処理チップ（実施例1-（5）の方法で作製）に、1-エチル-2,3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド（400mM）とN-ヒドロキシスクシンイミド（100mM）との混合液を添加し、20分間静置後、HBS-Nバッファー（ピアコア社製、pH7.4）で洗浄した。次に、ニュートラルアビジン溶液（100μg/ml、HBS-Nバッファー）を添加し、30分静置後、HBS-Nバッファーで洗浄した。以上の操作により、ニュートラルアビジンを各測定チップ表面に共有結合で固定化した。ニュートラルアビジンの添加前と洗浄後の共鳴シグナル（RU値）変化量をニュートラルアビジンの固定化量（RU値）とした。

なお、上記で用いたHBS-Nバッファーの組成は、H E P E S（N-2-Hydroxyethyl

lpiperazine-N'-2-ethanesulfonicAcid) 0.01mol/l (pH7.4)、NaCl 0.15mol/lである。

【0080】

さらに、エタノールアミン・HCl溶液 (1M、pH8.5) を各測定チップに添加後、HBS-Nバッファで洗浄することにより、ニュートラルアビジンと反応せずに残存したCOOH基をブロックした。

【0081】

次に、各測定チップを本発明の表面プラズモン共鳴測定装置に設置し、D-ビオチン ($0.5 \mu\text{g/ml}$ 、HBS-Nバッファ) を各測定チップに添加し、10分間静置後、HBS-Nバッファで洗浄した。D-ビオチンの添加前と洗浄後の共鳴シグナル (RU値) 変化量をニュートラルアビジンに対するD-ビオチンの結合量とした。

【0082】

(3) 測定時のベースライン安定性の評価

特に低分子の検体化合物の結合を検出する場合、測定時のベースラインが不安定であると、その結合を検出することが極めて困難となる。

【0083】

ベースラインの安定性は以下の方法で評価した。まず、各測定チップに前記 (2) と同様の方法でニュートラルアビジンを固定化した。次にそれらの測定チップを本発明の表面プラズモン共鳴測定装置に設置し、HBS-Nバッファを添加した。そのまま30分間静置し、その間の共鳴シグナル (RU値) 変化量を記録した。この共鳴シグナル (RU値) 変化量は10RU以下であることが好ましく、5RU以下であることがさらに好ましい。

【0084】

(4) 結果

表1に蛋白質の非特異吸着の測定結果、表2に蛋白質・検体化合物間の相互作用の測定結果、表3に測定時のベースラインの安定性を示す。

【0085】

【表 1】

表1

サンプル		非特異吸着量(RU値)		備考
No	表面処理	BSA	アビジン	
1-1	SAM処理膜	632	1350	比較例
1-2	PMMA/NaOH処理膜	7	18	本発明
1-3	PS/オゾン処理膜	16	35	本発明

【0086】

【表 2】

表2

サンプル		ニュートラルアビジン 結合量(RU値)	D-ビオチン 結合量(RU値)	備考
No	表面処理			
2-1	SAM処理膜	1350	26	比較例
2-2	PMMA/NaOH処理膜	1530	28	本発明
2-3	PS/オゾン処理膜	1490	27	本発明

【0087】

【表 3】

表3

サンプル		ベースライン安定性 (Δ RU)	備考
No	表面処理		
3-1	SAM処理膜	-23	比較例
3-2	A/NaOH処	-3	本発明
3-3	オゾン処理	-6	本発明

【0088】

表1の結果から、本発明により、極めて蛋白質の非特異吸着の少ない表面を提供できることがわかる。表2の結果から、本発明の場合でも、従来の方法と同様に蛋白質の固定化、および検体化合物の検出が可能ながわかる。表3の結果から、本発明により、測定時のベースラインを安定化できることがわかる。即ち、本発明により、非特異吸着を抑制し、かつ測定時のベースラインの安定性に優

れた表面プラズモン共鳴測定装置用の測定チップを提供することができた。

【0089】

【発明の効果】

本発明により、非特異吸着を抑制し、かつ測定時のベースラインの安定性に優れた表面プラズモン共鳴測定装置用の測定チップを提供することが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、表面プラズモン共鳴測定装置を示す。

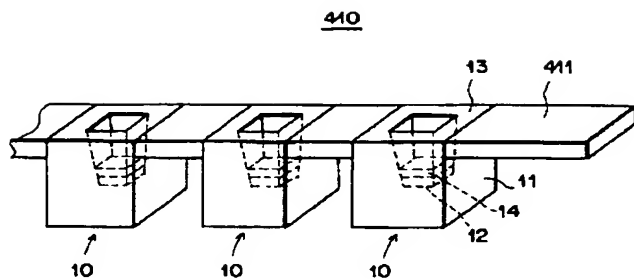
【図2】

図2は、誘電体ブロックを示す。

【符号の説明】

- 10 測定ユニット
- 11 誘電体ブロック
- 12 金属膜
- 13 試料保持枠
- 14 センシング物質
- 31 レーザ光源
- 32 集光レンズ
- 40 光検出器
- S40 出力信号
- 400 ガイドロッド
- 401 スライドブロック
- 402 精密ねじ
- 403 パルスモータ
- 404 モータコントローラ
- 410 ユニット連結体
- 411 連結部材

【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 非特異吸着を抑制し、かつ安定した測定ベースラインを与えることができる、表面プラズモン共鳴測定装置に用いられる測定チップを提供すること。

【解決手段】 誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように、かつ、種々の入射角成分を含むようにして入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態を検出する光検出手段とを備えてなる表面プラズモン共鳴測定装置に用いられるための測定チップであって、上記誘電体ブロックと上記金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む1つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化され、かつ前記金属膜が疎水性高分子化合物でコーティングされている上記の測定チップ。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 7 7 7 8 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 1 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地
氏 名	富士写真フイルム株式会社